

First Hit☐ [Generate Collection](#) [Print](#)

L1: Entry 2 of 2

File: DWPI

Aug 16, 1990

DERWENT-ACC-NO: 1990-254786

DERWENT-WEEK: 199034

COPYRIGHT 2004 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Virus inactivation in liquids - by generating cavitation

INVENTOR: CRUEGER, W; KLOPP, R

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

BAYER AG

FARB

BRAN & LUEBBE GMBH

BRLU

PRIORITY-DATA: 1989DE-3903648 (February 8, 1989), 1989DE-3943590 (February 8, 1989)

[Search Selected](#)[Search ALL](#)[Clear](#)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
<input type="checkbox"/> DE 3903648 A	August 16, 1990		000	
<input type="checkbox"/> DE 3943590 A	May 23, 1991		000	
<input type="checkbox"/> DE 3943590 C2	May 24, 1995		004	A61L002/02

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
DE 3903648A	February 8, 1989	1989DE-3903648	
DE 3943590A	February 8, 1989	1989DE-3943590	
DE 3943590C2	February 8, 1989	1989DE-3903648	Div ex
DE 3943590C2	February 8, 1989	1989DE-3943590	
DE 3943590C2		DE 3903648	Div ex

INT-CL (IPC): A61L 2/02; C02F 1/36; C12N 7/04

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 3903648A

BASIC-ABSTRACT:

Inactivation of viruses in liqs. is effected by generating cavitation within the liq.

Pref. cavitation is generated (a) ultrasonically, (b) by passing the liq. through a momogeniser nozzle, or (c) by a combination of (a).

USE/ADVANTAGE - The process may be used to eliminate phage infection in bacterial

cultures (e.g. starter cultures in the dairy industry) or to inactivate viruses in recombinant cell cultures (e.g. for prodn. of blood factors). The process is stated to overcome the disadvantages of chemical and heat sterilisation and ultrafiltration processes. @ (7pp @ (7pp Dwg.No.1/4)@

ABSTRACTED-PUB-NO:

DE 3943590C

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

An installation for deactivating viruses in liquids, includes creating cavitation in the liq. using a high pressure pump and a homogenising valve.

The pump is a membrane pump and the valve pref. has a number of over flow edge sections.

ADVANTAGE - The installation is simple and reliable.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/2

TITLE-TERMS: VIRUS INACTIVATE LIQUID GENERATE CAVITATE

DERWENT-CLASS: D13 D22 P34

CPI-CODES: D05-A04; D05-H08; D09-A02;

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1990-110324

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N1990-197388

PTO 04-2383

German Patent No. 3,903,648 A 1
(Offenlegungsschrift)

METHOD AND INSTALLATION FOR THE INACTIVATION OF VIRUS IN LIQUIDS

Rainer Klopp and Wulf Crueger

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
WASHINGTON, D.C. MARCH 2004
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY
GERMAN PATENT OFFICE
PATENT NO. 3,903,648
(Offenlegungsschrift)

Int. Cl. ⁵ :	A 61 L 2/02 C 02 F 1/36 //A 23 C 7/00
Filing No.:	P 39 03 648.0
Filing Date:	February 8, 1989
Laid-Open to Public Inspection:	August 16, 1990

METHOD AND INSTALLATION FOR THE INACTIVATION OF VIRUS IN LIQUIDS

[Verfahren und Anlage zur Inaktivierung von in Flüssigkeiten befindlichen Viren]

Inventors:	Rainer Klopp Wulf Crueger
Applicants:	Bran + Luebbe GmbH Bayer AG

Examination request filed according to Section 44, Patent Law.

The invention concerns a method and an installation for the inactivation of viruses in liquids.

Viruses can be rendered harmless, as is known, by chemical substances (chemical sterilization) or by heating the liquid (heat sterilization). Moreover, the removal of viruses from liquids by means of ultrafiltration is known.

One disadvantage of chemical sterilization is found in the fact that the substances required for the inactivation remain in the liquid itself and can lead to disadvantageous secondary effects. The disadvantage of heat sterilization is to be found in that a thermal decomposition or at least a modification of the components present in the liquid can occur. This is particularly problematic, if the liquid comprises culture supernatants, which contain highly sensitive substances, such as proteins.

In the removal of viruses by means of ultrafiltration, it is disadvantageous that this method is not suitable for the treatment of suspensions, since in this case, a separation of the solid phase would take place.

In addition, there is the danger of the adsorption of components from the solution of the filter materials. Furthermore, on a technical scale, the process can be carried out only with great difficulty and at great cost, under sterile conditions. Also, the filters must be cleaned and replaced at regular intervals, which can lead to disposal difficulties, depending on the type of filtered-out viruses.

The goal of the invention is to make available a method and an installation to carry out the method, which make it possible to inactivate viruses in liquids without the disadvantageous effects of the known methods. This goal is attained in accordance with the characterizing parts of Claims 1 and 10.

Advantageous developments of the method are described in Subclaims 2-9. Subclaims 11-18 concern advantageous developments of the installation to carry out the method.

Surprisingly, even such small organic components as viruses are inactivated by a cavitation effect. Other accompanying substances remain advantageously unchanged within the liquid. In experiments, it has been shown to be particularly favorable if an energy input into the liquids is set between 10,000 Ws to 150,000 Ws per liter.

This method is particularly useful for quality assurance in the purification of culture supernatants of cell cultures and in the workup of products, which are produced by the fermentation of organisms with recombinant DNA. As an example, but not exclusively, there is production of plasma factor VIII and other blood factors.

This virus inactivation method is also very favorable in the production of microbial cultures which are very bacteriophage-sensitive.

To produce cavitation, an oscillator immersed in the liquid, for example, can be used. It is advantageous if the liquid is also conducted past the oscillating surface. This can also take place in that the oscillating structure is located within a tube at which or around which, the liquid flows through the tube.

Alternately, the tube itself can also be designed so that its walls are excited to produce radial oscillations in one section. Areas then form on the tube walls in which the liquid cavitates.

The cavitation can be produced, in a particularly low-cost and effective manner, by an acceleration of the liquid when it flows over the borders. The energy required for this can be advantageously made available by high-pressure pumps, wherein the energy supplied can be used for the inactivation of viruses, at a high yield, with homogenizing valves.

The inactivation effect can be advantageously increased even more in that sound is introduced into the liquid.

This takes place particularly effectively if, at the same time, an area of a compression space acts as a sonic source.

The inactivating effect of the method can be optimized if the frequency of the introduced sound can be changed.

The method can be made particularly efficient, if the liquid repeatedly flows over the borders and, inbetween, is compressed in tapering spaces.

Depending on the required degree of inactivation of the viruses, it may be advantageous if the pressure loss which occurs when the liquid flow over the borders is again compensated for by high-pressure pumps located inbetween.

To carry out the method of the invention, an installation is suitable which has the characterizing features of Claim 10. Such an installation can be constructed at low cost from components which can already be found on the market.

In the production of metabolites or proteins with microorganisms or cell cultures with recombinant DNA or when working with pathogenic viruses, the installation can then be operated, in a particularly safe and sterile manner, if a leak-proof diaphragm pump is used as a high-pressure pump.

A particularly great inactivating effect can be attained if the homogenizing valve has several overflow borders, connected in series.

The effect can be increased even more if tapering compression spaces are arranged between the overflow borders.

The construction of the homogenizing valve with a slot width, which changes cyclically, leads to a further advantageous performance increase of the entire installation.

For practical application cases, it has proved to be particularly advantageous, if sound with a frequency between 20 kHz and 1 MHz is introduced into the liquid.

The sound can then be introduced very effectively into the liquid, if the surfaces of the homogenizing valve, which delimit the tapering compression spaces, are manufactured from magnetostrictive material, which is exposed to an alternating magnetic field.

As an alternative to this, the introduction of the sound into the liquid by piezoelectric materials has proved good in another development, as a low-cost solution, with which the surfaces delimiting the compression spaces are either coated or if a sound source, consisting of piezoelectric material, is located within the compression spaces.

The invention is described in drawings, wherein other advantageous details can be deduced from the drawings.

The figures in the drawings show the following:

Figure 1, schematically, the installation in accordance with the invention;

Figure 2, schematically, the slot construction of a suitable homogenizing valve; and

Figures 3-4, The dependence of the surviving phages, measured in the embodiments, on the acoustic irradiation time.

In Figure 1, 1 denotes a liquid which is loaded with viruses.

Liquids can be carbohydrate- or protein-containing solutions during a workup process to produce pharmaceuticals or water for the production, which must be prepared free of viruses or be freed from viruses. This plays a considerable role, among other things, in the milk industry, since the starter cultures can be destroyed by bacteriophages. The glutamic acid fermentation with *Corynebacterium glutamicum* is also extremely sensitive to phages.

The liquid is in a basin 2. This can be, for example, a swimming pool, whose water quality is to be improved. The high-pressure pump 3 suctions the liquid through the suction conduit 4 and takes it to the homogenizing valve 6 via the compressed conduit 5 under a pressure of ca. 1000 bar. In this valve, the liquid 1 cavitates so that the viruses are inactivated, in accordance with the invention. Via the exit conduit 7, the liquid improved in its quality is conducted to the basin 2, once more. In this way, the liquid circulated is raised in its quality.

From Figure 1, one can also see that the installation can be set up as a closed system with sterile-technical, satisfactory components.

In Figure 2, the valve parts designated with 8 and 9 denote annular piston ends, which are designed, in sectional view, in the shape of wedges and with their wedge tips and the opposite baffle 10, form annular slots 11 and 12. A tapering compression space 13 is formed between the annular slots by the wedge-shaped development of the annular piston ends 8 and 9, which are arranged concentrically. To introduce sound into the liquid 1, which flows in the direction of the arrow 14, the annular pistons 8 can also be made from magnetostrictive material, which is exposed to a magnetic field which changes cyclically.

In another development, one or more surfaces 15, 16 and/or 17, delimiting the annular space 13, can themselves be used for the introduction of sound.

For this purpose, as shown in Figure 2, the surface 15, for example, can also be coated with piezoelectric material 18.

It is also possible to place an oscillating element 19 within the compression space, with parts not depicted.

With the aid of such a valve designed in accordance with the invention, it is possible to inactivate viruses in liquid effectively.

The inactivating influence of the cavitation and the introduced sound is explained in such a way that, for example, phages are deprived of their viral activity through separation of their testicles and/or by splitting their DNA head.

The effectiveness of the method was proved with the aid of two different types of viruses, wherein the viruses could no longer be grown on coli strains in samples with a content of

50 mL and a concentration of ca. 100,000 viruses per milliliter after treatment for 4-5 min.

Example 1

From an inoculation of the strain *Escheria coli* 54, cells are transferred with an inoculation loop into a 1-L Erlenmeyer flask with 120 mL nutrient solution (10 g/L Bacto-Trypto-Difco, 5 g/L Bacto Yeast Extract, 10 g/l NaCl analytically pure, distilled water, sterilized at 121°C for 20 min) and incubated on a mechanical shaker at 290 rpm and at 37°C, for 16 h. The extinction, as a measure of the growth of the *E. coli* culture solution, is 49.3 OD (578 nm) after this time.

From this culture, 33.5 mL are added to a nutrient solution soft agar (nutrient solution, as above, plus 7.5 g/L agar) and poured into plates (10 mL).

After a cooling of these test plates, 0.1 mL of a bacteriophage dilution series is taken, using a spatula, and incubated at 37°C for 16 h. The bacteriophage titer is counted with the aid of the phagolysis areolas.

E. coli phages MAL 315 are used as phagolysate in a starting concentration of 2×10^5 phages/mL for the experiment. 50 mL of the phagolysate are irradiated acoustically in a precooled beaker with an ultrasonic apparatus KLN from the Ultraschall GmbH, Heppenheim, System 582, apparatus type 250/101 and a KLN head with a frequency of 15 KHz and an output of 10 W. In this procedure, cavitation is observed. The first sample was taken at the beginning of the experiment; the others, at intervals of 1 min. The experiment runs for 5 min. With these samples, a dilution series of 10^{-1} to 10^{-5} is prepared with nutrient solution, after this time. To test the phage titer, the solution is poured into plates. Figure 3 gives the removal of the reproduction-capable phages as a function of the acoustic irradiation time. After 5 min, the phage titer of 10^5 phages/mL is lowered to 0-10 phages/mL. By the described treatment, the virus concentration was, therefore, lowered by more than 10,000-fold.

Example 2

With the same methods as described in Example 1, plates are prepared and *E. coli* phages MAL 103 are acoustically irradiated with a frequency of 15 KHz and an output of 15 W. Already after 4 min (Figure 4), beginning with 10^5 phages/mL, only 0-10 reproduction-capable phages/mL are still detected.

Claims

1. Method for the inactivation of viruses in liquid, characterized in that cavitation is produced within the liquid.
2. Method according to Claim 1, characterized in that the cavitation is produced by a change in the flow rate in the liquid.

3. Method according to Claim 1, characterized in that the cavitation is produced by a cyclic movement of a surface delimiting the liquid, wherein preferably, the liquid is also moved past the surface.

4. Method according to Claims 1, 2, or 3, characterized in that the liquid is conducted to a homogenizing valve, under high pressure, preferably between 500 bar and 1500 bar. *50-150-MPa*

5. Method according to Claims 1, 2, 3, or 4, characterized in that a homogenizing valve is used to produce the cavitation.

6. Method according to Claims 1, 2, 3, 4, or 5, characterized in that a high-pressure diaphragm pump is used to produce the high pressure.

7. Method according to Claims 4, 5, or 6, characterized in that in the homogenizing valve, sound, preferably with a frequency between 20 kHz and 1 MHz, is also introduced into the liquid.

8. Method according to one or more of Claims 1-7, characterized in that the inactivation of the viruses takes place with an acoustic irradiation time of 1 to 20 min, preferably, 5 min.

9. Method according to one or more of Claims 1-8, characterized in that the inactivation of the viruses takes place under sterile conditions. *X*

10. Installation to carry out the method according to one or more of the preceding claims, characterized in that it at least has a high-pressure pump with a downstream homogenizing valve.

11. Installation according to Claim 10, characterized in that the high-pressure pump is designed as a diaphragm pump.

12. Installation according to Claim 10 or 11, characterized in that the homogenizing valve has several slot-forming overflow borders, connected in series. *X*

13. Installation according to one of Claims 10-12, characterized in that tapering compression spaces are located between the overflow borders.

14. Installation according to one or more of Claims 10-13, characterized in that at least one of the overflow borders is designed so that it moves cyclically.

15. Installation according to one or more of Claims 10-14, characterized in that at least one surface delimiting a compression space is designed so that it moves cyclically.

16. Installation according to one or more of Claims 10-15, characterized in that a sonic source is located within a compression space.

17. Installation according to one or more of Claims 10-16, characterized in that the frequency of the cyclic changes can be adjusted.

18. Installation according to one or more of Claims 10-17, characterized in that it has several high-pressure pumps with the corresponding homogenizing valve connected in series.

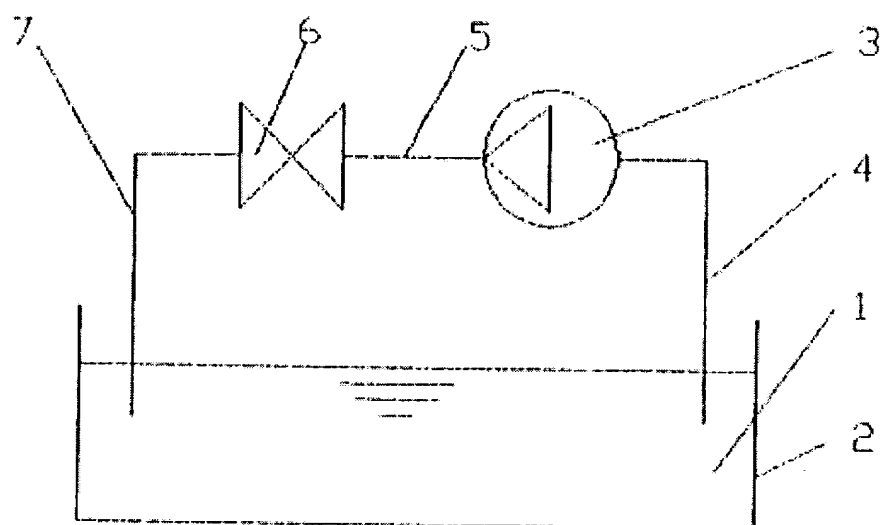


Figure 1

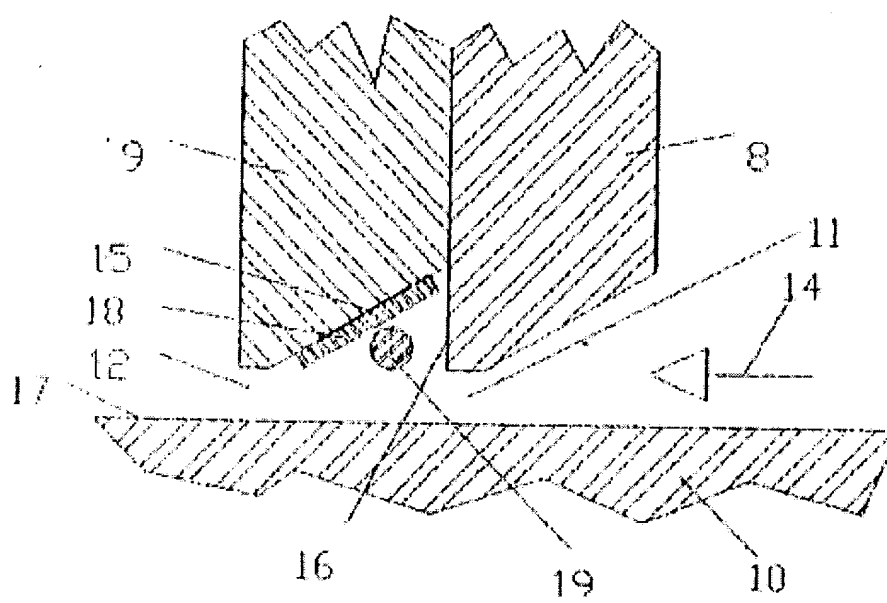


Figure 2

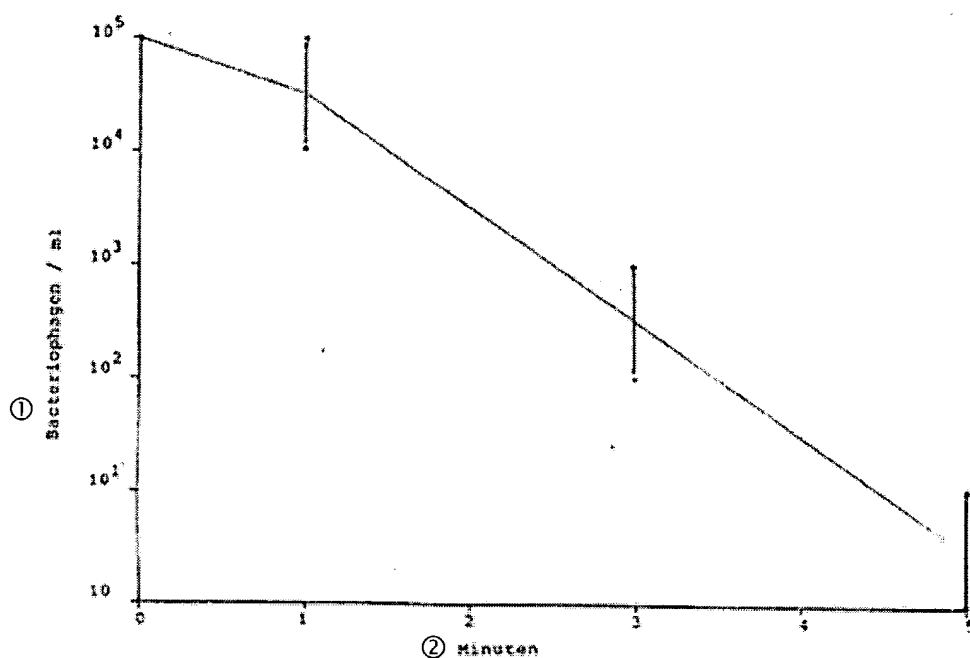


Figure 3. Dependence of the surviving phages MAL 315 on the acoustic irradiation time.

Key: 1 Bacteriophages/mL
2 Min

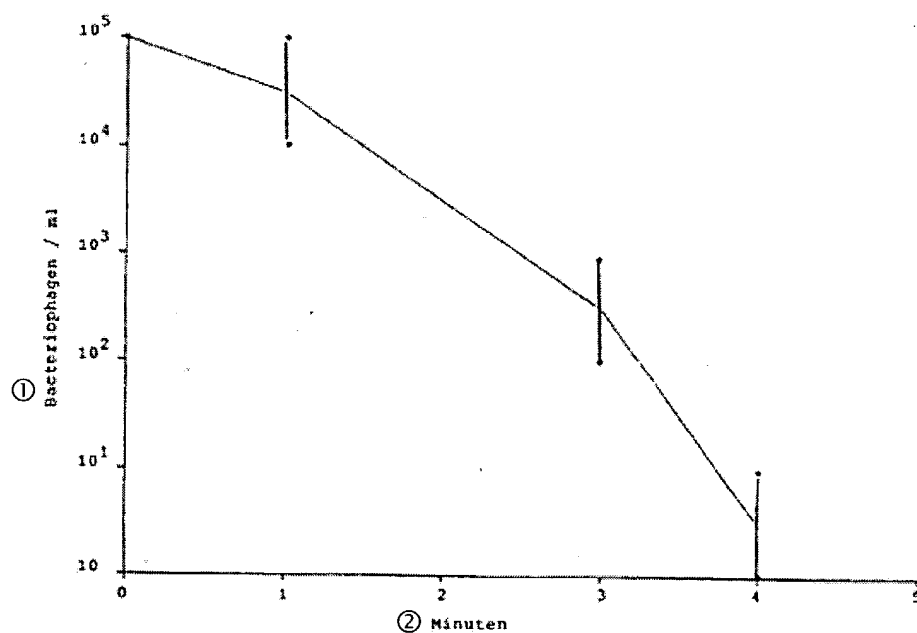


Figure 4. Dependence of the surviving phages MAL 103 on the acoustic irradiation time.

Key: 1 Bacteriophages/mL
2 Min

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3903648 A 1**

⑤ Int. Cl. 5:
A61L 2/02
C 02 F 1/36
// A23C 7/00

⑳ Aktenzeichen: P 39 03 648.0
㉑ Anmeldetag: 8. 2. 89
㉒ Offenlegungstag: 16. 8. 90

DE 3903648 A 1

㉑ Anmelder:
Bran + Luebbe GmbH, 2000 Norderstedt, DE; Bayer
AG, 5090 Leverkusen, DE

㉒ Vertreter:
Meyer, L., Dipl.-Ing.; Vonnemann, G., Dipl.-Ing.
Dr.-Ing., Pat.-Anwälte, 2000 Hamburg

㉓ Erfinder:
Klopp, Rainer, Dipl.-Ing., 2000 Norderstedt, DE;
Crueger, Wulf, Dr., 4006 Erkrath, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren und Anlage zur Inaktivierung von in Flüssigkeiten befindlichen Viren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von in Flüssigkeiten befindlichen Viren, wobei innerhalb der Flüssigkeit Kavitation erzeugt wird. Die Kavitation wird vorzugsweise durch Veränderung der Fließgeschwindigkeit in der Flüssigkeit erzeugt.

Außerdem betrifft die Erfindung eine Anlage zur Durchführung des Verfahrens, wobei diese mindestens eine Hochdruckpumpe mit nachgeschaltetem Homogenisierventil aufweist. Die Hochdruckpumpe ist vorzugsweise als Membranpumpe ausgebildet.

DE 3903648 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Anlage zur Inaktivierung von in Flüssigkeiten befindlichen Viren.

Viren können bekanntlich durch chemische Substanzen (chemische Sterilisation) oder durch Erhitzen der Flüssigkeit (Hitzesterilisation) unschädlich gemacht werden. Des weiteren ist bekannt, Viren mittels Ultrafiltration aus Flüssigkeiten zu entfernen.

Ein Nachteil der chemischen Sterilisation liegt darin, daß die zur Inaktivierung erforderlichen Substanzen in der Flüssigkeit selbst verbleiben und zu nachteiligen Nebenwirkungen führen können. Der Nachteil der Hitzesterilisation liegt darin, daß eine thermische Zersetzung oder zumindest Modifikation der in der Flüssigkeit vorhandenen Komponenten eintreten kann. Dies ist besonders gravierend, wenn es sich bei der Flüssigkeit um Kulturüberstände handelt, die hochempfindliche Substanzen, wie z. B. Proteine enthalten.

Bei der Entfernung von Viren mittels Ultrafiltration wirkt sich nachteilig aus, daß dieses Verfahren nicht zur Behandlung von Suspensionen geeignet ist, da in diesem Fall eine Abtrennung der festen Phase erfolgen würde.

Zusätzlich besteht die Gefahr der Adsorption von Bestandteilen aus der Lösung der Filtermaterialien. Weiterhin kann der Prozeß im technischen Maßstab nur sehr schwer und kostenaufwendig unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Auch müssen die Filter in regelmäßigen Abständen gereinigt und gewechselt werden, das je nach Art der herausgefilterten Viren zu Entsorgungsschwierigkeiten führen kann.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Anlage zur Durchführung des Verfahrens zur Verfügung zu stellen, die es ermöglichen, ohne die nachteiligen Wirkungen der bekannten Verfahren Viren in Flüssigkeiten zu inaktivieren. Diese Aufgabe wird entsprechend den kennzeichnenden Teilen der Ansprüche 1 und 10 gelöst.

Vorteilhafte Ausgestaltungen des Verfahrens sind in den Unteransprüchen 2 bis 9 beschrieben. Die Unteransprüche 11 bis 18 betreffen vorteilhafte Ausgestaltungen der Anlage zur Durchführung des Verfahrens.

Überraschenderweise werden selbst so kleine organische Bestandteile, wie sie Viren darstellen, durch Kavitationswirkung inaktiviert. Dabei bleiben andere Begleitsubstanzen innerhalb der Flüssigkeit vorteilhaft unverändert. Als besonders günstig hat sich bei Versuchen ergeben, wenn dabei ein Energieeintrag in die Flüssigkeit zwischen 10 000 Ws bis 150 000 Ws je Liter eingestellt wird.

Besonders nützlich ist diese Methode zur Qualitätssicherung bei der Reinigung von Kulturüberständen von Zellkulturen und bei der Aufreinigung von Produkten, die durch Fermentation von Organismen mit rekombinierter DNA hergestellt werden. Als Beispiel, aber nicht ausschließlich, ist die Produktion von Plasma Faktor VIII und anderen Blutfaktoren anzusehen.

Aber auch bei der Produktion von mikrobiellen Kulturen, die sehr Bacteriophagen-empfindlich sind, ist diese Methode der Virus-Inaktivierung sehr günstig.

Zur Erzeugung von Kavitation kann beispielsweise ein in die Flüssigkeit eingetauchter Schwinger dienen. Vorteilhaft wird die Flüssigkeit zusätzlich an der schwingenden Oberfläche vorbeigeführt. Dies kann auch dadurch erfolgen, daß eine schwingende Struktur innerhalb eines Rohres angeordnet wird, an der oder um die herum die Flüssigkeit durch das Rohr fließt.

Alternativ kann auch das Rohr selbst so ausgebildet sein, daß seine Wandungen in einem Abschnitt zu radialen Schwingungen angeregt werden. An der Rohrwandung entstehen dann Bereiche, in denen die Flüssigkeit kavitiert.

Besonders kostengünstig und wirksam läßt sich die Kavitation durch eine Beschleunigung der Flüssigkeit beim Überströmen von Kanten erzeugen. Die dazu erforderliche Energie läßt sich vorteilhaft durch Hochdruckpumpen bereitstellen, wobei die angebotene Energie mit hoher Ausbeute durch Homogenisierventile zur Inaktivierung von Viren genutzt werden kann.

Der Inaktivierungseffekt läßt sich vorteilhaft noch weiter dadurch erhöhen, daß in die Flüssigkeit Schall eingeleitet wird.

Dies erfolgt besonders wirksam, wenn gleichzeitig eine Fläche eines Verdichtungsraumes als Schallquelle wirkt.

Optimieren läßt sich der inaktivierende Effekt des Verfahrens dann, wenn sich die Frequenz des eingeleiteten Schalls verändern läßt.

Besonders leistungsfähig gestaltet sich das Verfahren, wenn die Flüssigkeit mehrfach Kanten überströmt und dazwischen in sich verjüngenden Räumen verdichtet wird.

Je nach dem erforderlichen Inaktivierungsgrad der Viren, kann es vorteilhaft sein, wenn der beim Überströmen der Kanten entstehende Druckverlust durch dazwischen angeordnete Hochdruckpumpen wieder ausgeglichen wird.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine Anlage geeignet, die die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 10 aufweist. Eine derartige Anlage läßt sich kostengünstig aus bereits auf dem Markt befindlichen Komponenten aufbauen.

Bei der Produktion von Metaboliten oder Proteinen mit Mikroorganismen oder Zellkulturen mit rekombinierter DNA oder bei Arbeiten mit pathogenen Viren kann die Anlage besonders sicher und steril dann betrieben werden, wenn als Hochdruckpumpe eine lecksichere Membranpumpe verwendet wird.

Ein besonders großer inaktivierender Effekt läßt sich erzielen, wenn das Homogenisierventil mehrere hintereinandergeschaltete Überströmkanten aufweist.

Noch weiter kann die Wirkung gesteigert werden, wenn zwischen den Überströmkanten verjüngende Verdichtungsräume angeordnet sind.

Die Ausbildung des Homogenisierventils mit sich zyklisch verändernder Spaltweite führt zu weiterer vorteilhafter Leistungssteigerung der gesamten Anlage.

Für praktische Anwendungsfälle hat es sich als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn in die Flüssigkeit Schall mit einer Frequenz zwischen 20 kHz und 1 MHz eingeleitet wird.

Sehr effektiv läßt sich der Schall dann in die Flüssigkeit einleiten, wenn die Flächen des Homogenisierventils, die die sich verjüngenden Verdichtungsräume begrenzen, aus magnetostruktivem Material gefertigt sind, das einem sich wechselnden Magnetfeld ausgesetzt ist.

Alternativ dazu hat sich in anderer Ausgestaltung als kostengünstige Lösung die Einleitung des Schalls in die Flüssigkeit durch piezoelektrische Materialien erwiesen, mit denen die die Verdichtungsräume begrenzenden Flächen entweder belegt sind oder aber wenn eine aus piezoelektrischem Material bestehende Schallquelle innerhalb der Verdichtungsräume angeordnet wird.

Die Erfindung wird in Zeichnungen beschrieben, wobei weitere vorteilhafte Einzelheiten den Zeichnungen

zu entnehmen sind.

Die Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 schematisch die erfindungsgemäße Anlage,

Fig. 2 schematisch die Spaltausbildung eines geeigneten Homogenisierventils und

Fig. 3–4 die bei den Ausführungsbeispielen gemessene Abhängigkeit der überlebenden Phagen von der Beschallungszeit.

In Fig. 1 bedeutet 1 eine Flüssigkeit, die mit Viren beladen ist.

Flüssigkeiten können kohlenhydrat- oder proteinhaltige Lösungen während eines Aufarbeitungsprozesses zu Pharmazeutika oder aber auch Wasser für die Produktion sein, das virusfrei aufbereitet werden oder von Viren befreit werden muß. Dies spielt u. a. auch in der Milchindustrie eine erhebliche Rolle, da die Starterkulturen durch Bacteriophagen vernichtet werden können. Die Glutaminsäure-Fermentation mit *Corynebacterium glutamicum* ist ebenfalls extrem phagenempfindlich.

Die Flüssigkeit befindet sich in einem Bassin 2. Dabei kann es sich beispielsweise auch um ein Schwimmbad handeln, dessen Wasserqualität verbessert werden soll. Die Hochdruckpumpe 3 saugt durch die Ansaugleitung 4 die Flüssigkeit an und führt sie über die Druckleitung 5 mit einem Druck von ca. 1000 bar dem Homogenisierventil 6 zu. In diesem Ventil kavitiert die Flüssigkeit 1, so daß die Viren erfindungsgemäß inaktiviert werden. Über die Austrittsleitung 7 wird die in der Qualität verbesserte Flüssigkeit dem Bassin 2 wieder zugeführt. Auf diese Weise wird die im Kreis geführte Flüssigkeit in ihrer Qualität angehoben.

Aus der Fig. 1 ist zusätzlich ersichtlich, daß die Anlage als geschlossenes System mit steriltechnischen einwandfreien Bauteilen erstellt werden kann.

In Fig. 2 bedeuten die mit 8 und 9 bezeichneten Ventileile ringförmige Kolbenende, die im Schnitt keilförmig ausgebildet sind und mit ihren Keilspitzen und der gegenüberliegenden Leitfläche 10 Ringspalten 11 und 12 bilden. Zwischen den Ringspalten entsteht durch die keilförmige Ausbildung der ringförmigen Kolbenenden 8 und 9, die konzentrisch angeordnet sind, ein sich verjüngender Verdichtungsraum 13. Zur Einleitung von Schall in die Flüssigkeit 1, die in Pfeilrichtung 14 fließt, kann der Ringkolben 8 auch magnetostruktivem Material gefertigt sein, das einem sich zyklisch verändernden Magnetfeld ausgesetzt ist.

In anderer Ausgestaltung kann eine oder mehrere den Ringraum 13 begrenzende Fläche 15, 16 und/oder 17 selbst zur Schalleinleitung genutzt werden.

Dazu kann, wie in Fig. 2 dargestellt, beispielsweise die Fläche 15 auch mit piezoelektrischem Material 18 belegt sein.

Es ist auch möglich, durch nicht dargestellte Teile einen Schwingkörper 19 innerhalb des Verdichtungsraumes anzuordnen.

Mit Hilfe eines derartig erfindungsgemäß ausgebildeten Ventils lassen sich wirkungsvoll in Flüssigkeiten befindliche Viren inaktivieren.

Der inaktivierende Einfluß der Kavitation und des eingeleiteten Schalls wird dadurch erklärt, daß beispielsweise Phagen ihrer viralen Aktivität durch Abtrennung ihrer Testikel und/oder durch Abspaltung ihres DNA-Kopfes beraubt werden.

Die Wirksamkeit des Verfahrens wurde anhand von zwei verschiedenen Typen von Viren nachgewiesen, wobei in Proben mit einem Inhalt von 50 Millilitern und einer Konzentration von ca. 100 000 Viren je Milliliter nach vier bis fünfminütiger Behandlung die Viren sich

auf Coli-Stämmen nicht mehr anzüchten ließen.

Beispiel 1

Von einer Abimpfung des Stammes *Escheria coli* 54 werden Zellen mit einer Impfpföse in 1 l Erlenmeyer-Kolben mit 120 ml Nährlösung (10 g/l Bacto-Trypto-Difco, 5 g/l Bacto Yeast Extract, 10 g/l NaCl p.a., aqua dest., 20 min 121°C sterilisiert) überführt und 16 h bei 37°C, 290 Upm auf der Schüttelmaschine bebrütet. Die Extinktion als Maß des Wachstums der *E. coli* Kulturlösung beträgt nach dieser Zeit 49,3 OD (578 nm).

Von dieser Kultur werden 33,5 ml in einen Nährlösungssoft-agar (Nährlösung wie oben plus 7,5 g/l Agar) bei 45°C gegeben und in Platten (10 ml) gegossen.

Nach Erkalten dieser Testplatten spachtelt man je 0,1 ml einer Bacteriophagenverdünnsreihe auf und bebrütet 16 h bei 37°C. Der Bacteriophagentiter wird anhand der Phagenlyse-Höfe ausgezählt.

E. coli-Phagen MAL 315 werden als Phagenlysate in einer Ausgangskonzentration von 2×10^5 Phagen/ml für den Versuch eingesetzt. 50 ml des Phagenlysates werden in einem vorgekühlten Becherglas mit einem Ultraschallgerät KLN der Firma Ultraschall GmbH, Heppenheim, System 582, Gerätetyp 250/101 und einem KLN-Kopf mit einer Frequenz von 15 KHz und einer Leistung von 10 Watt beschallt. Bei diesem Vorgehen wird Kavitation beobachtet. Die erste Probe wurde zu Versuchsbeginn, die weiteren im Abstand von einer Minute gezogen. Der Versuch läuft 5 min. Nach dieser Zeit wird mit den Proben eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-5} mit Nährlösung hergestellt. Zum Austesten des Phagentiter plattiert man aus. In Fig. 3 ist die Abnahme der vermehrungsfähigen Phagen in Abhängigkeit von der Beschallungszeit wiedergegeben. Nach 5 min ist der Phagentiter von 10^5 Phagen/ml auf 0 bis 10 Phagen/ml gesunken. Durch die beschriebene Behandlung wurde also die Viruskonzentration um mehr als das 10 000fache gesenkt.

Beispiel 2

Mit den gleichen Methoden, wie in Beispiel 1 beschrieben, werden Platten hergestellt und *E. coli*-Phagen MAL 103 mit einer Frequenz von 15 KHz und einer Leistung von 15 Watt beschallt. Bereits nach 4 min (Fig. 4) werden ausgehend von 10^5 Phagen/ml nur noch 0 bis 10 vermehrungsfähige Phagen/ml nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Inaktivierung von in Flüssigkeiten befindlichen Viren, dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb der Flüssigkeit Kavitation erzeugt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kavitation durch Veränderung der Fließgeschwindigkeit in der Flüssigkeit erzeugt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kavitation durch zyklisches Bewegen einer die Flüssigkeit begrenzenden Fläche erzeugt wird, wobei vorzugsweise die Flüssigkeit an der Fläche zusätzlich vorbeibewegt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeit unter hohem Druck, vorzugsweise zwischen 500 bar und 1500 bar, einem Homogenisierventil zugeführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Homogenisierventil zur Erzeugung der Kavitation verwendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung des hohen Druckes eine Hochdruckmembranpumpe verwendet wird. 5
7. Verfahren nach Anspruch 4, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß im Homogenisierventil in die Flüssigkeit zusätzlich Schall, vorzugsweise mit einer Frequenz zwischen 20 Kilohertz und 1 Megahertz, eingeleitet wird. 10
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung der Viren mit einer Beschallungszeit von 1 bis 20 min, bevorzugt 5 min, erfolgt. 15
9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung der Viren unter sterilen Bedingungen erfolgt. 20
10. Anlage zur Durchführung des Verfahrens nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Hochdruckpumpe mit nachgeschaltetem Homogenisierventil aufweist. 25
11. Anlage nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hochdruckpumpe als Membranpumpe ausgebildet ist.
12. Anlage nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Homogenisierventil mehrere hintereinandergeschaltete spaltenbildende Überströmkanten aufweist. 30
13. Anlage nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Überströmkanten sich verjüngende Verdichtungsräume angeordnet sind. 35
14. Anlage nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Überströmkanten sich zyklisch verändernd ausgebildet ist. 40
15. Anlage nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine einen Verdichtungsraum begrenzende Fläche sich zyklisch verändernd ausgebildet ist.
16. Anlage nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb eines Verdichtungsraumes eine Schallquelle angeordnet ist. 45
17. Anlage nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Frequenz der zyklischen Veränderungen einstellbar ist. 50
18. Anlage nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie mehrere Hochdruckpumpen mit zugehörigem Homogenisierventil hintereinandergeschaltet aufweist. 55

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

60

65

— Leerseite —

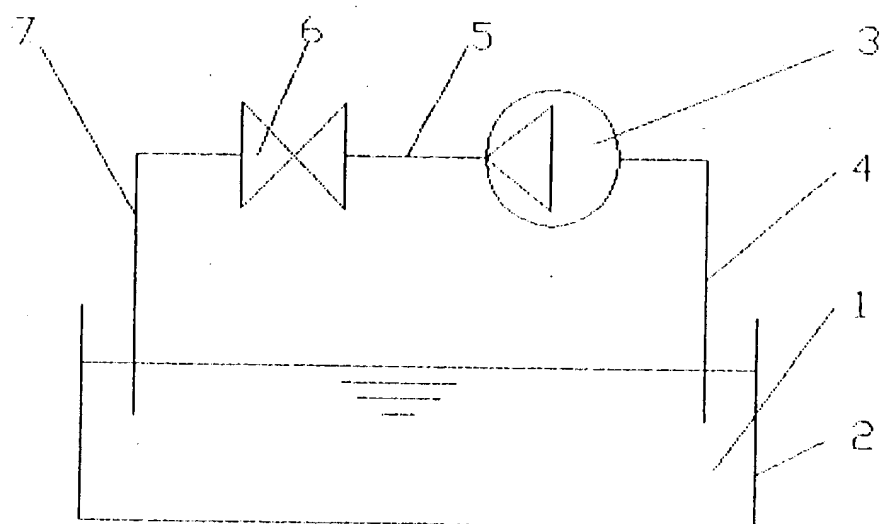


Fig. 1

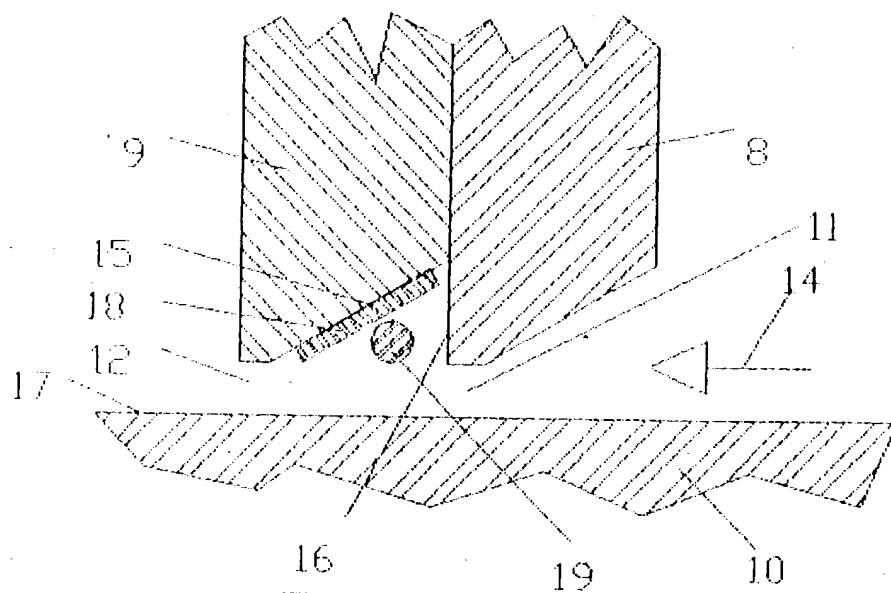
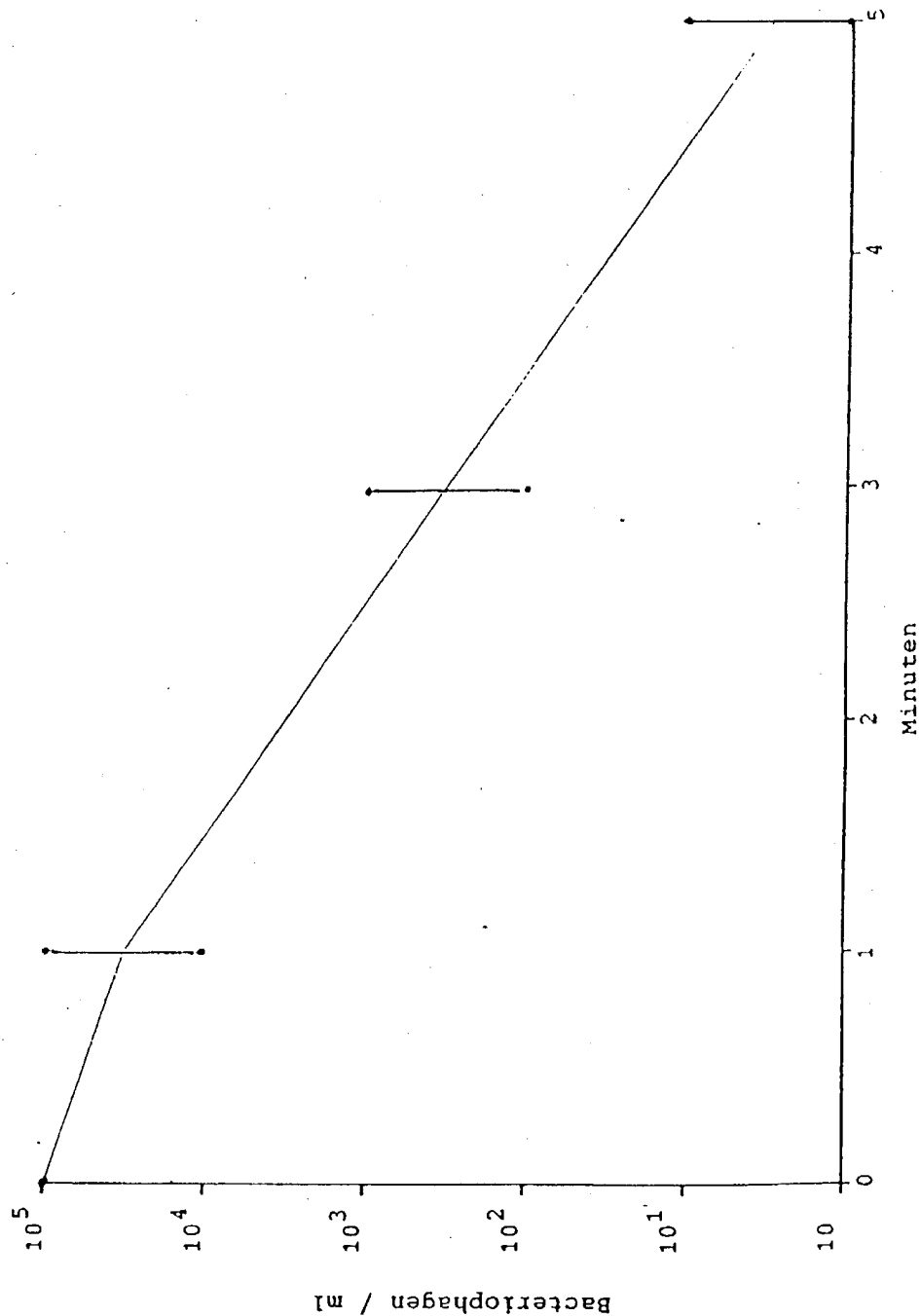


Fig. 2

Fig.3

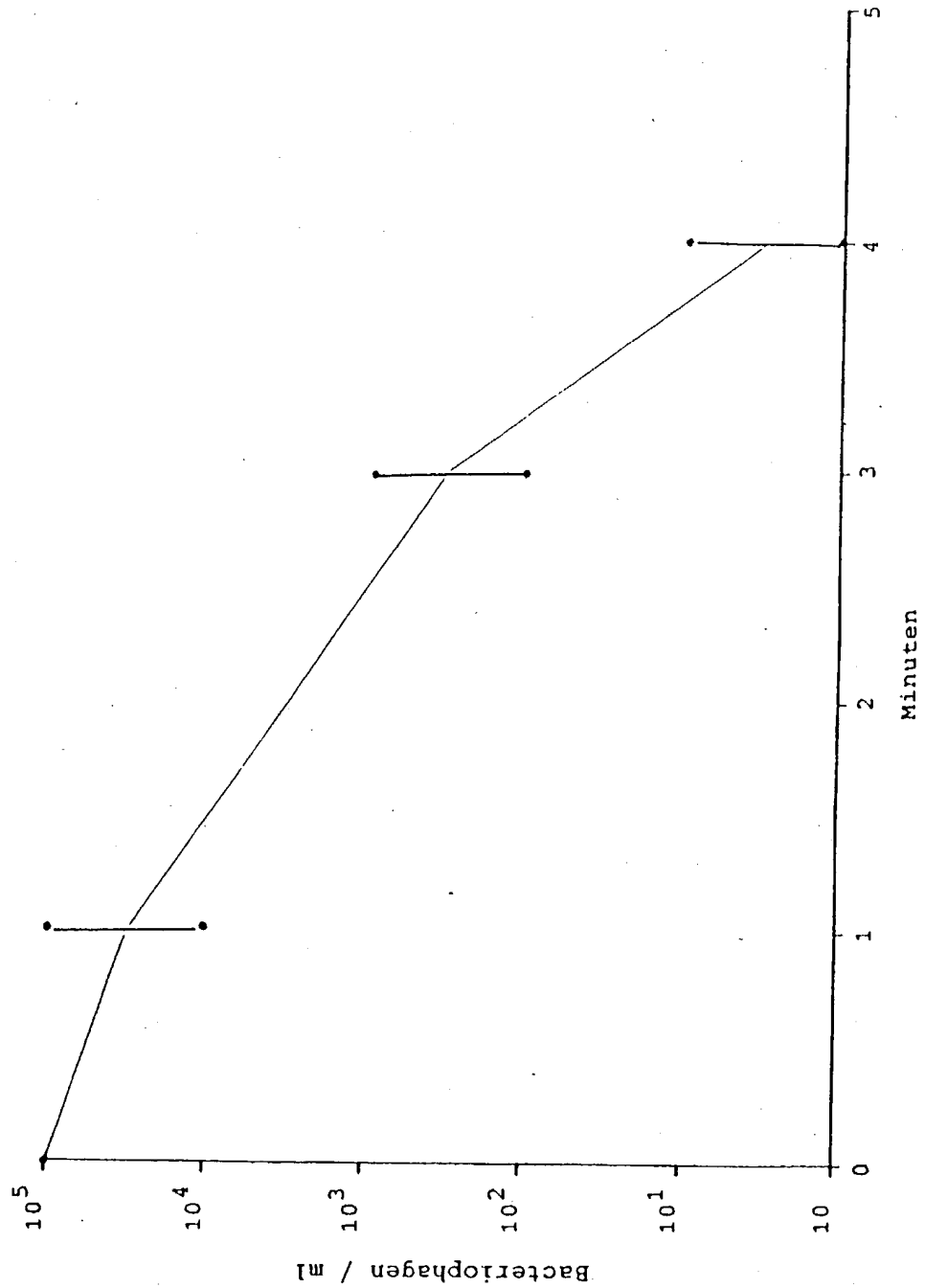
Abhängigkeit der Überlebenden Phagen MAL 315 von der Beschallungszeit



008 033/74

Fig. 4

Abhängigkeit der Überlebenden Phagen MAL 103 von der Beschallungszeit



008 033/74